CG020 Genomika

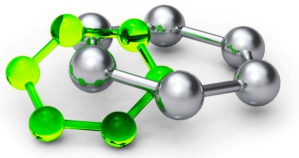
Přednáška 1

Identifikace genů

Jan Hejátko

Funkční genomika a proteomika rostlin,
Středoevropský technologický institut (CEITEC)
a
Národní centrum pro výzkum biomolekul,
Přírodovědecká fakulta,

Masarykova univerzita, Brno
hejatko@sci.muni.cz, www.ceitec.eu



Literatura

- Zdrojová literatura ke kapitole 2

- Plant Functional Genomics, ed. Erich Grotewold, 2003, Humana Press, Totowa, New Jersey
- Majoros, W.H., Pertea, M., Antonescu, C. and Salzberg, S.L. (2003) GlimmerM, Exonomy, and Unveil: three ab initio eukaryotic genefinders. *Nucleic Acids Research*, **31**(13).
- Singh, G. and Lykke-Andersen, J. (2003) New insights into the formation of active nonsensemediated decay complexes. *TRENDS in Biochemical Sciences*, **28** (464).
- Wang, L. and Wessler, S.R. (1998) Inefficient reinitiation is responsible for upstream open reading frame-mediated translational repression of the maize R gene. *Plant Cell*, **10**, (1733)
- de Souza et al. (1998) Toward a resolution of the introns earlyylate debate: Only phase zero introns are correlated with the structure of ancient proteins *PNAS*, **95**, (5094)
- Feuillet and Keller (2002) Comparative genomics in the grass family: molecular characterization of grass genome structure and evolution *Ann Bot,* 89 (3-10)
- Frobius, A.C., Matus, D.Q., and Seaver, E.C. (2008). Genomic organization and expression demonstrate spatial and temporal Hox gene colinearity in the lophotrochozoan Capitella sp. I. PLoS One 3, e4004

CEITEC

Osnova

- Postupy „přímé“ a reverzní genetiky
  - rozdíly v myšlenkových přístupech k identifikaci genů a jejich funkcí
- Identifikace genů *ab initio*
  - struktura genů a jejich vyhledávání
  - genomová kolinearita a genová homologie
- Experimentální identifikace genů
  - příprava genově obohacených knihoven pomocí technologie metylačního filtrování
  - EST knihovny
  - přímá a reverzní genetika

Osnova

- Postupy „přímé“ a reverzní genetiky
  - rozdíly v myšlenkových přístupech k identifikaci genů a jejich funkcí

Přímá vs. reverzní genetika

Revoluce v chápání pojmu genu

Přístupy „klasické“ genetiky

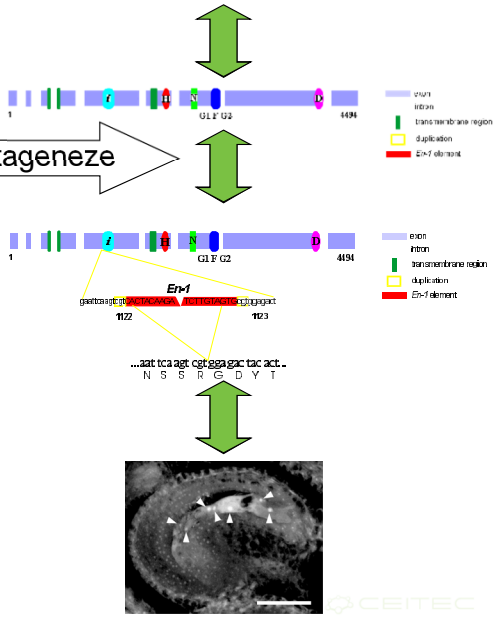
3 : 1

?

„Reverzně genetický“ přístup

5‘TTATATATATATATTAAAAAATAAAATAA
AAGAACAAAAAAGAAAATAAAATA….3‘

inzerční mutageneze

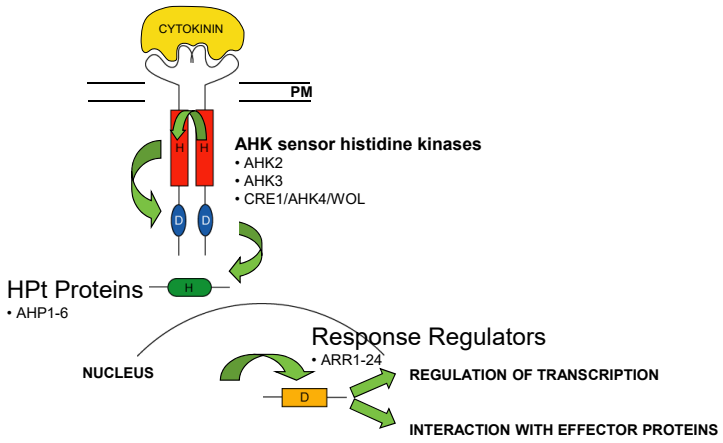


Identifikace role genu *ARR21*

• Předpokládaný přenašeč signálu u dvoukomponentního signálního systému *Arabidopsis*

Identifikace role genu *ARR21*

Recent Model of the CK Signaling via Multistep Phosphorelay (MSP) Pathway



CEITEC

Identifikace role genu *ARR21*

- Předpokládaný přenašeč signálu u dvoukomponentního signálního systému *Arabidopsis*
- Mutant identifikován vyhledáváním v databázi inzerčních mutantů (SINS-sequenced insertion site) pomocí programu BLAST

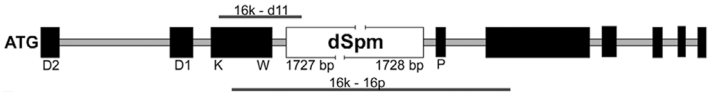
CEITEC

Identifikace role genu *ARR21* – izolace inz. mutanta

- **vyhledávání v databázi inzerčních mutantů (SINS)**

```
Insert_SINS: 01_09_64
Query: 80    tcctagcgttcatgagcgtaccatacttgacaanagagaacgtagccagccatttacagg 139
             ||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 58319 tcctagcgttcatgagcgtaccatacttgacaagagagaacgtagccagccatttacagg 58378
Arr21:  1830

Insert_SINS: 01_09_64
Query: 140   tttgatatctcttgtcaaaaatgtttttggattttactgt 179
              |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 58379 tttgatatctcttgtcaaaaatgtttttggattttactgt 58418
Arr21:  1890
```

- **lokalizace inzerce *dSpm* v genomové sekvenci *ARR21* pomocí sekvenace PCR produktů**



Identifikace role genu *ARR21*

• Předpokládaný přenašeč signálu u dvoukomponentního signálního systému *Arabidopsis*

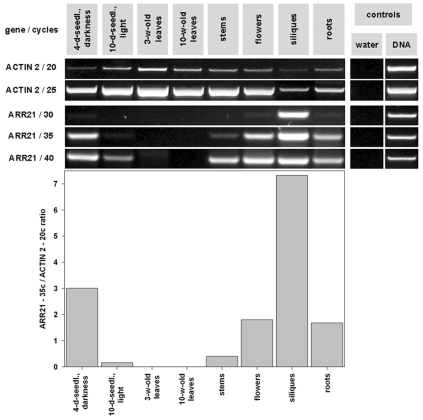
• Mutant identifikován vyhledáváním v databázi inzerčních mutantů (SINS-sequenced insertion site) pomocí programu BLAST

• Exprese *ARR21* u standardního typu a Inhibice exprese u inzerčního mutanta potvrzena na úrovni RNA

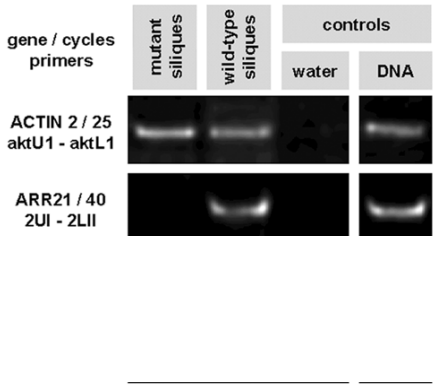
CEITEC

Identifikace role genu *ARR21* – analýza exprese

Standardní typ



Inzerční mutant



CEITEC

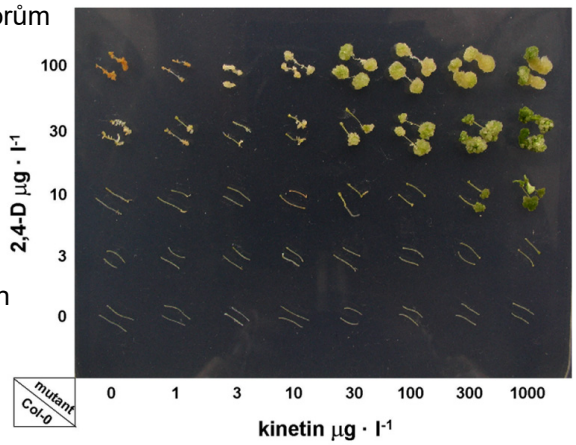
Identifikace role genu *ARR21*

- Předpokládaný přenašeč signálu u dvoukomponentního signálního systému *Arabidopsis*
- Mutant identifikován vyhledáváním v databázi inzerčních mutantů (SINS-sequenced insertion site) pomocí programu BLAST
- Exprese *ARR21* u standardního typu a Inhibice exprese u inzerčního mutanta potvrzena na úrovni RNA
- Analýza fenotypu inzečního mutanta

CEITEC

Identifikace role genu *ARR21* – analýza fenotypu mutanta

- Analýza citlivosti k regulátorům růstu rostlin
  - 2,4-D a kinetin
  - etylén
  - světlo různých vlnových délek
- Doba kvetení i počet semen nezměněn



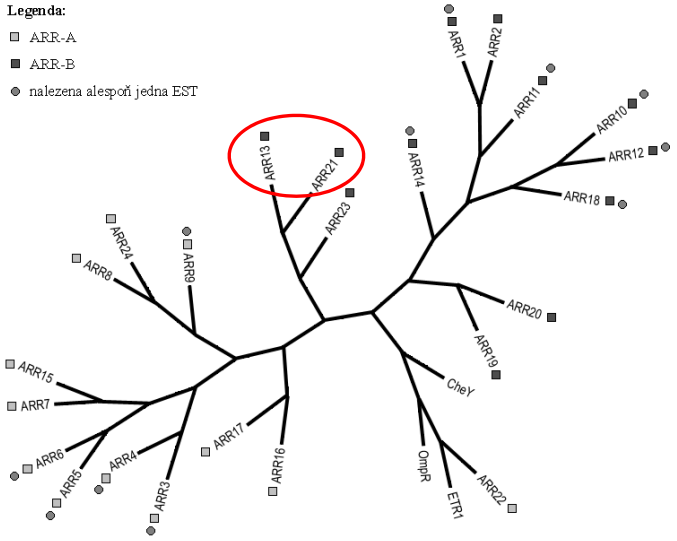
CEITEC

Identifikace role genu *ARR21* – příčiny absence fenotypu

- Funkční redundance v rámci genové rodiny?

CEITEC

Identifikace role genu *ARR21* – příbuznost ARR genů



Identifikace role genu *ARR21* – příčiny absence fenotypu

- Funkční redundance v rámci genové rodiny?
- Fenotypový projev pouze za velmi specifických podmínek (?)

CEITEC

Identifikace role genu *ARR21* – shrnutí

- Gen *ARR21* identifikován pomocí srovnávací analýzy genomu *Arabidopsis*
- Na základě analýzy sekvence byla předpovězena jeho funkce
- Byla prokázána místně specifická exprese genu *ARR21* na úrovni RNA
- Identifikace funkce genu pomocí inzerční mutageneze v případě *ARR21* ve vývoji *Arabidopsis* byla neúspěšná, pravděpodobně v důsledku funkční redundance v rámci genové rodiny

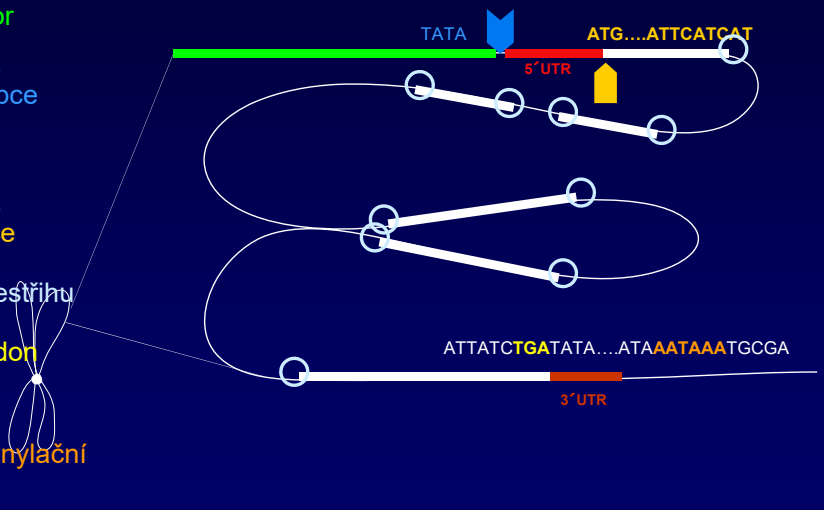
Osnova

- Postupy „přímé“ a reverzní genetiky
  - rozdíly v myšlenkových přístupech k identifikaci genů a jejich funkcí
- Identifikace genů *ab initio*
  - struktura genů a jejich vyhledávání

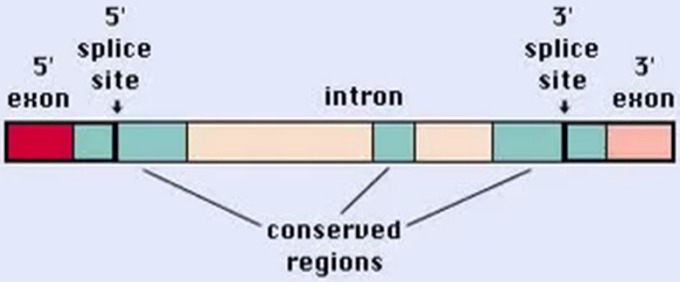
CEITEC

Struktura genů

- promotor
- počátek transkripce
- 5´UTR
- počátek translace
- místa sestřihu
- stop kodon
- 3´UTR
- polyadenylační signál



Sestřih RNA



CEITEC

Identifikace Genů *Ab Initio*

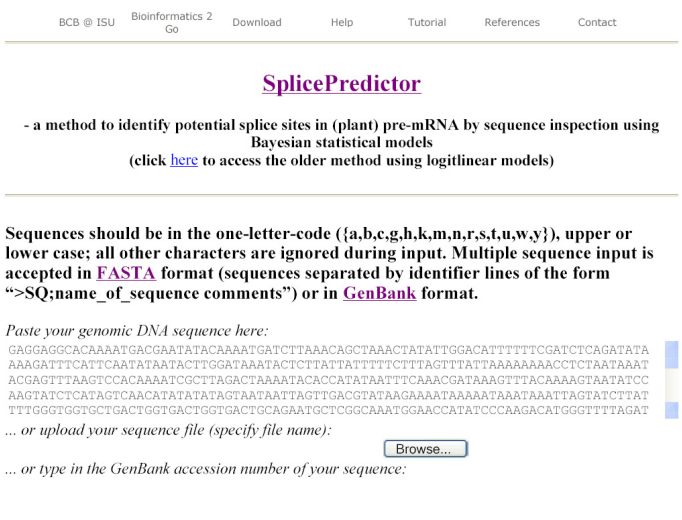
- zanedbání 5‘ a 3‘ UTR
- identifikace počátku translace (ATG) a stop kodonu (TAG, TAA, TGA)
- nalezení donorových (většinou GT) a akceptorových (AG) míst sestřihu
- využití různých statistických modelů (např. Hidden Markov Model, HMM, viz doporučená studijní literatura, Majoros et al., 2003) k posouzení a ohodnocení váhy identifikovaných donorových a akceptorových míst

Predikce míst sestřihu

- programy pro predikci míst sestřihu (specificita přibližně 35%)
  - GeneSplicer (http://www.tigr.org/tdb/GeneSplicer/gene_spl.html)
  - SplicePredictor (http://deepc2.psi.iastate.edu/cgi-bin/sp.cgi)

CEITEC

SplicePredictor



CEITEC

SplicePredictor

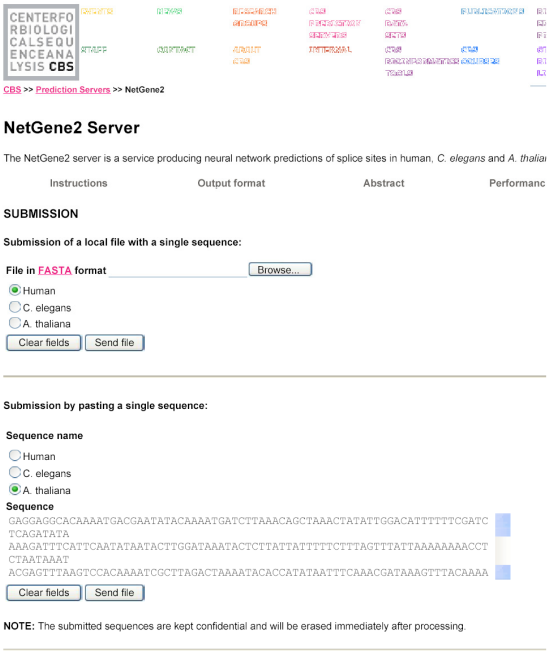
What do the output columns mean?

```
SplicePredictor.   Version of February 13, 2005.
Date run: Wed Nov  9 11:30:14 2005

Species:                        Homo sapiens
Model:                          2-class Bayesian
Prediction cutoff (2 ln[BF]):     3.00
Local pruning:                  on
Non-canonical sites:            not scored

Sequence    1:   your-sequence, from 1 to 9490.

Potential splice sites

t   q      loc      sequence          P      c      rho    gamma    *  P*R*G*
A   <--      75 ttttttcgatctcAGat   0.973   7.16   0.000  0.000    7 (5 1 1)
A   <--     134 attatttttctttAGtt   0.999  14.86   0.000  0.000    7 (5 1 1)
A   <--     500 gatttgttgttgttAGtc   0.977   7.48   0.000  0.000    7 (5 1 1)
A   <--     780 totgttattgtatAGgt   0.986   8.56   0.000  0.000    7 (5 1 1)
A   <--     848 tatttttgaaatAGat   0.968   6.80   0.000  0.000    7 (5 1 1)
A   <--    1051 caatttattttttaAGaa   0.930   5.19   0.000  0.000    7 (5 1 1)
A   <--    1213 ttatttattttttAGtt   0.998  12.14   0.000  0.000    7 (5 1 1)
A   <--    1373 tttcctctctcaacAGga   0.999  13.17   0.000  0.000    7 (5 1 1)
A   <--    1487 tttatatattgatAGtg   0.883   4.04   0.000  0.000    7 (5 1 1)
A   <--    1581 atgtgttgcttgtAGga   0.982   8.03   0.000  0.000    7 (5 1 1)
A   <--    1781 ggttgtgcgaaatAGgg   0.886   4.10   0.000  0.000    7 (5 1 1)
A   <--    2440 taattaaaaatttAGat   0.939   5.46   0.000  0.000    7 (5 1 1)
A   <--    2479 catctaaaattttAGat   0.942   5.59   0.000  0.000    7 (5 1 1)
D ----->    2546           aagGTagta   0.909   4.61   0.885  1.903   15 (5 5 5)
A   <--    2572 ttttttttttggcAGca   0.930   5.16   0.000  0.000    7 (5 1 1)
A  <----    2763 ctcaaattcacaaAGgt   0.873   3.86   0.185  0.000   11 (5 5 1)
A  <----    2782 tttcgttttcattAGcg   0.952   5.98   0.220  0.000   11 (5 5 1)
A  <----    3022 tttgttctgtactaAGct   0.956   6.16   0.221  0.000   11 (5 5 1)
A  <----    3048 ctttgcaatacatAGga   0.973   7.15   0.229  0.000   11 (5 5 1)
A   <--    3171 cgtcgtcatttatAGta   0.988   8.74   0.000  0.000    7 (5 1 1)
A  <---    3286 ctttgttatcaaAGag   0.993  10.03   0.000  0.086    8 (5 1 2)
D =====>    3372           aatGTaagg   0.933   5.28   0.855  1.849   15 (5 5 5)
A  <----    3453 aatgcttcccgtatAGaa   0.916   4.77   0.293  0.065   32 (5 5 2)
A   <--    3581 cgatcgccgttctAGgt   0.850   3.47   0.000  0.000    7 (5 1 1)
D ----->    3649           cacGTatta   0.933   5.25   0.000  1.848   11 (5 1 5)
A   <--    3695 ttgtggttatacAGtt   0.907   4.56   0.000  0.000    7 (5 1 1)
A  <---    4234 atcatcgtcctcAGgat   0.990  12.82   0.000  0.000    8 (5 1 2)
A   <--    4351 tttcttacattgcAGaa   0.991   9.42   0.000  0.000    7 (5 1 1)
A   <--    4633 gtcttgtttctttAGgg   0.879   3.97   0.000  0.000    7 (5 1 1)
A   <--    4976 cttgttgtttctcAGct   0.952   5.98   0.000  0.000    7 (5 1 1)
A   <--    5004 ttttttttgccAGag   0.996  11.17   0.000  0.000    7 (5 1 1)
D ----->    5356           caaGTgaat   0.821   3.04   0.387  0.000   11 (5 5 1)
D ----->    5384           ttgGTaaga   0.941   5.54   0.478  0.090   13 (5 5 3)
A   <--    5403 actctgtttctttAGct   0.894   4.26   0.000  0.000    7 (5 1 1)
A  <----    5441 ctttctctctaacAGaa   0.995  10.43   0.387  0.000   11 (5 5 1)
A  <----    5472 ttgttaaaattacAGct   0.965   6.62   0.478  0.090   13 (5 5 3)
D ----->    5745           gcgGTaaga   0.991   9.48   0.990  1.956   15 (5 5 5)
A  <----    5808 catcatatcctaaAGgt   0.948   5.83   0.458  0.000   11 (5 5 1)
A  <----    6135 ggtctattattatAGgt   0.999  13.59   0.508  0.050   12 (5 5 2)
A   <--    6352 ggatttttcacctcAGag   0.938   5.42   0.000  0.000    7 (5 1 1)
```

Identifikace Genů *Ab Initio*

- programy pro predikci míst sestřihu (specificita přibližně 35%)
  - GeneSplicer (http://www.tigr.org/tdb/GeneSplicer/gene_spl.html)
  - SplicePredictor (http://deepc2.psi.iastate.edu/cgi-bin/sp.cgi)
  - NetGene2 (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/)

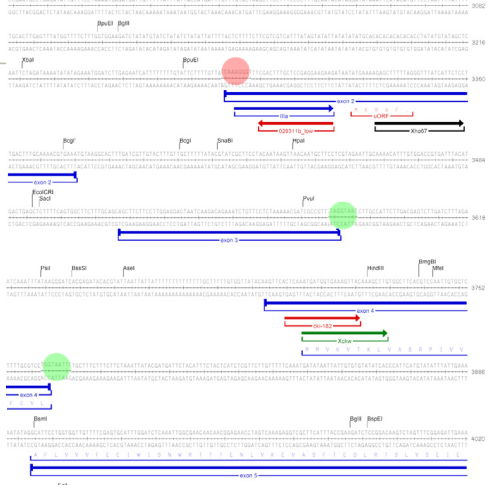
NetGene 2



NetGene 2

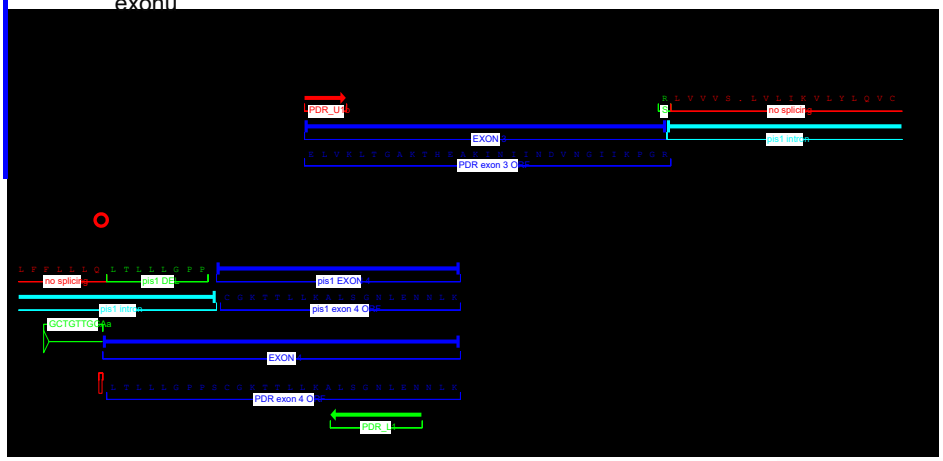
Prediction done

```
********** NetGene2 v. 2.4 **********

The sequence: Sequence has the following composition:

Length: 9490 nucleotides.
31.8% A, 17.0% C, 19.6% G, 31.7% T, 0.0% X, 36.5% G+C

Donor splice sites, direct strand
---------------------------------
                pos 5'->3'  phase strand  confidence  5'     exon intron    3'
                      1704      0      +        0.87       TTCCAAACAC'GT'TAATATTT
                      1906      0      +        0.99       CGGTGAACGG'GT'CAGAACAT
                      3521      1      +        1.00       GGCGTTCTAG'GT'AATGTTGA H
                      3765      1      +        1.00       TTCGTTCCTG'GT'AATTCTGC H
                      4134      0      +        0.74       TCAAACACAG'GT'TGTTAAAA
                      4619      1      +        0.74       AGCAAGAAAG'GT'CTTGTTTC
                      4915      0      +        0.94       CGTTCCTCTG'GT'AAATACTG
                      5356      0      +        0.87       TCTCAACCAA'GT'CAATGTTT
                      5384      1      +        1.00       GATTTGGTTG'GT'AAGACTCT H
                      5809      1      +        1.00       TATCCTAAAG'GT'GTGTCCAA
                      6057      0      +        1.00       GCAGTCTTTG'GT'AAGCTACT H
                      6096      1      +        0.74       CTCTTCACAA'GT'AAATCTAG
                      7369      0      +        1.00       GGACTGCCAA'GT'AAGTTTAA H
                      7886      0      +        0.74       GAACAAAAAG'GT'AGATGAA
                      9323      0      +        0.74       GAAGATTAGG'GT'TTTCTCT

Donor splice sites, complement strand
-------------------------------------
   pos 3'->5'  pos 5'->3'  phase strand  confidence  5'     exon intron    3'

Acceptor splice sites, direct strand
------------------------------------
                pos 5'->3'  phase strand  confidence  5'     intron exon    3'
                      1213      0      +        0.59       TATTTTTTAG'TTATGGAGAC
                      1221      2      +        0.87       AGTTATGGAG'ACAAGAATCG
                      1373      0      +        0.71       TCTCTCACAG'GACACAGAAT
                      1487      1      +        0.81       ATATTGATAG'TGGGACATTA
                      3284      0      +        0.87       GTTATCAAAG'GGTTCGACCT
                      4254      0      +        1.00       TGTTCTTCAG'ATCGCACCAT H
                      4832      2      +        0.54       AAAATTGCAG'TTCCAGTGGC
                      5004      0      +        0.94       TTTTTGCCAG'AGATACACAC
                      5472      1      +        0.96       AAAATTACAG'CTCTGCTCAA
                      6135      0      +        1.00       ATTATTATAG'GTAAGATTAA H
                      6490      1      +        0.90       AAAGTTACAG'TGGTGGAGAA
                      6744      0      +        0.59       TGTCAAACAG'TTTCGTAGAG
                      7447      0      +        0.96       TTCTGCACAG'ATGCCAGAAA
                      7780      2      +        0.76       TCCATTTCAG'ATACAGAACA
                      7786      2      +        0.92       TCAGATACAG'AACACATGCA
```



Sestřih RNA a adaptace

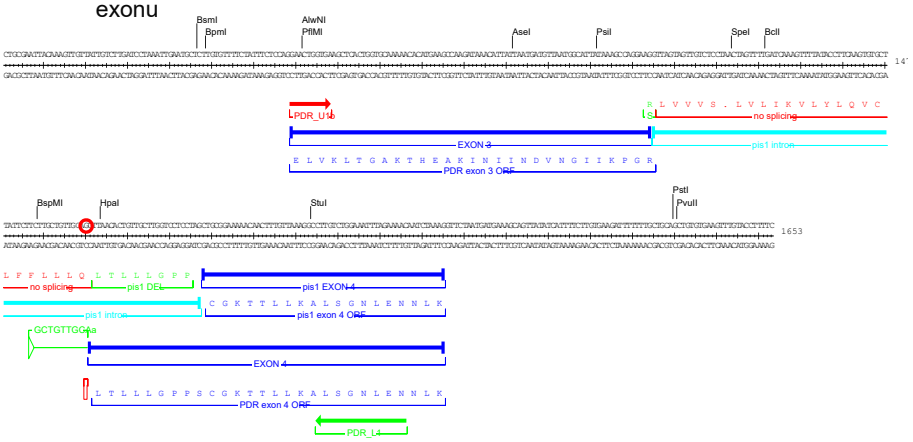
- odchylky rozpoznávání míst sestřihu u rostlin v praxi - příklad vývojové plasticity (nejen) rostlin
  - identifikace mutanta s bodovou mutací (tranzice G→A) přesně v místě sestřihu na 5‘ konci 4. exonu



CEITEC

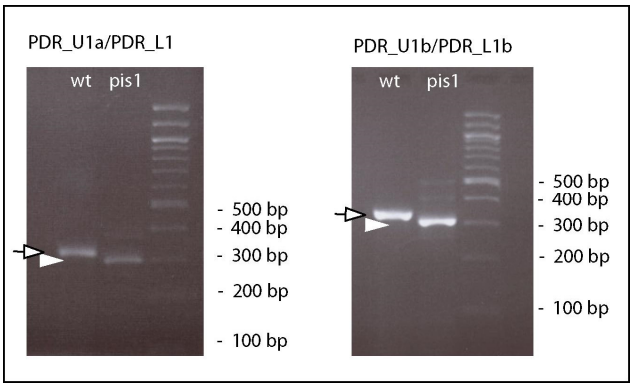
Sestřih RNA a adaptace

- odchylky rozpoznávání míst sestřihu u rostlin v praxi - příklad vývojové plasticity (nejen) rostlin
  - identifikace mutanta s bodovou mutací (tranzice G→A) přesně v místě sestřihu na 5‘ konci 4. exonu



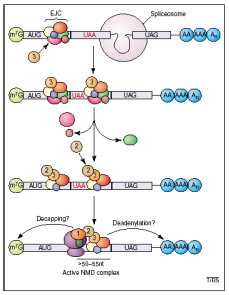
Sestřih RNA a adaptace

- identifikace mutanta s bodovou mutací (tranzice G→A) přesně v místě sestřihu na 5‘ konci 4. exonu
- analýza pomocí RT PCR prokázala přítomnost fragmentu kratšího než by odpovídalo cDNA po normálním sestřihu



Sestřih RNA a adaptace

- odchylky rozpoznávání míst sestřihu u rostlin v praxi - příklad vývojové plasticity (nejen) rostlin



- identifikace mutanta s bodovou mutací (tranzice G→A) přesně v místě sestřihu na 5‘ konci 4. exonu
- analýza pomocí RT PCR prokázala přítomnost fragmentu kratšího než by odpovídalo cDNA po normálním sestřihu
- sekvenace tohoto fragmentu pak ukázala na alternativní sesřih s využitím nejbližšího možného místa sestřihu v exonu 4
- existence podobných obranných mechanizmů prokázána i u jiných organizmů (např. nestabilita mutantní mRNA se vznikem předčasného stopkodonu (> 50-55 bp před normálním stop kodonem) u eukaryot, viz doporučená studijní literatura, Singh and Lykke-Andersen, 2003)

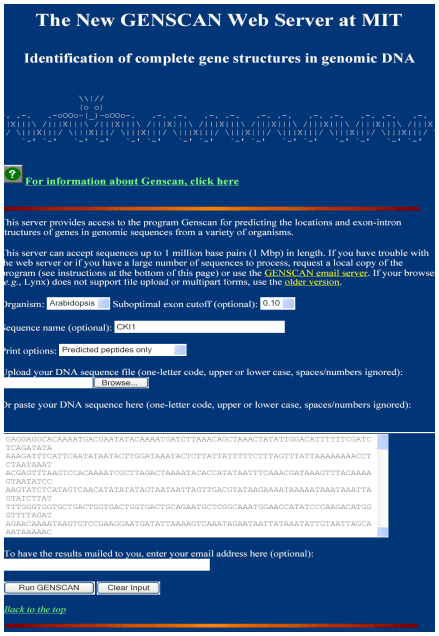
CEITEC

Identifikace genů *ab initio*

- programy pro predikci exonů
  - 4 typy exonů (podle polohy):
    - iniciační
    - vnitřní
    - terminální
    - jednoduché
  - programy kromě rozpoznávání míst sestřihu zohledňují i strukturu jednotlivých typů exonů

- iniciační:
  - Genescan (http://hollywood.mit.edu/GENSCAN.html)
  - GeneMark.hmm (http://opal.biology.gatech.edu/GeneMark/)
- interní:
  - MZEF (http://rulai.cshl.org/tools/genefinder/)

GENESCAN



The New GENSCAN Web Server at MIT

Identification of complete gene structures in genomic DNA

For information about Genscan, click here

This server provides access to the program Genscan for predicting the locations and exon-intron structures of genes in genomic sequences from a variety of organisms.

This server can accept sequences up to 1 million base pairs (1 Mbp) in length. If you have trouble with the web server or if you have a large number of sequences to process, request a local copy of the program (see instructions at the bottom of this page) or use the GENSCAN email server. If your browser (e.g., Lynx) does not support file upload or multipart forms, use the older version.

Organism: Arabidopsis | Suboptimal exon cutoff (optional): 0.10

Sequence name (optional): CKI1

Print options: Predicted peptides only

Upload your DNA sequence file (one-letter code, upper or lower case, spaces/numbers ignored):

Browse...

Or paste your DNA sequence here (one-letter code, upper or lower case, spaces/numbers ignored):

GAGGAGGCACAAAATGACGAATATACAAAATGATCTTAAACAGCTAAACTATATTGGACATTTTTCGATC
TCAGATATA
AAAGATTTCATTCAATATAATACTTGGATAAATACTCTTATTATTTTTCTTTAGTTTATTAAAAAAAACCT
CTAATAAAT
ACGAGTTTAAGTCCACAAAATCGCTTAGACTAAAATACACCATATAATTTCAAACGATAAAGTTTACAAAA
GTAATATCC
AAGTATCTCATAGTCAACATATATATAGTAATAATTAGTTGACGTATAAGAAAATAAAAATAAATAAATTA
GTATCTTAT
TTTGGGTGGTGCTGACTGGTGACTGGTGACTGCAGAATGCTCGGCAAATGGAACCATATCCCAAGACATGG
GTTTTAGAT
AGAACAAAATAAGTGTCCGAAGGAATGATATTAAAAGTCAAATAGAATAATTATAAATATTGTAATTAGCA
AATAAAAAC

To have the results mailed to you, enter your email address here (optional):

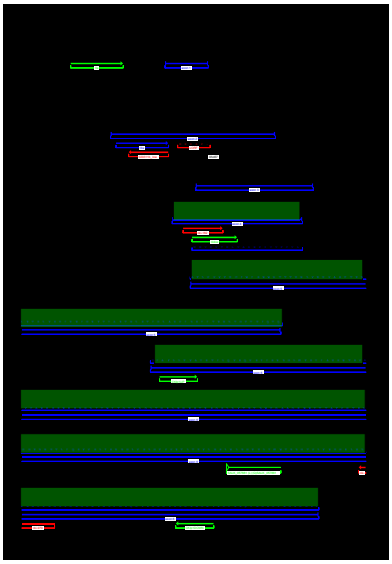
Run GENSCAN | Clear Input

Back to the top

GENESCAN

GENSCANW output for sequence CKI1

```
GENSCAN 1.0     Date run: 10-Nov-105     Time: 02:24:26

Sequence CKI1 : 9490 bp : 36.53% C+G : Isochore 1 ( 0 - 43 C+G%)

Parameter matrix: Arabidopsis.smat

Predicted genes/exons:


Gn.Ex Type S .Begin ...End .Len Fr Ph I/Ac Do/T CodRg P.... Tscr..
----- ---- - ------ ------ ---- -- -- ---- ---- ----- ----- ------

 1.00 Prom +   1497   1536   40                                -3.85
 1.01 Init +   3708   3764   57  2  0   63   51    37 0.499   4.03
 1.02 Intr +   3894   4133  240  2  0   -3    7   327 0.713  17.32
 1.03 Intr +   4255   4914  660  0  0   86   59   296 0.771  22.57
 1.04 Intr +   5005   5383  379  0  1   70   91   343 0.772  31.41
 1.05 Intr +   5473   6056  584  2  2   38   99   582 0.722  50.76
 1.06 Intr +   6136   7368 1233  0  0   68  108   655 0.977  56.86
 1.07 Term +   7448   7660  213  1  0   43   35   212 0.999  12.65
 1.08 PlyA +   7910   7915    6                                -0.45

 2.03 PlyA -   7976   7971    6                                -4.83
 2.02 Term -   8793   8050  744  0  0  107   37   542 0.997  48.46
 2.01 Init -   9253   8936  318  1  0  105   73   386 0.999  41.18

Suboptimal exons with probability > 0.100

Exnum Type S .Begin ...End .Len Fr Ph B/Ac Do/T CodRg P.... Tscr..
----- ---- - ------ ------ ---- -- -- ---- ---- ----- ----- ------

S.001 Init +   1867   1905   39  0  0   64   40    57 0.298   3.74
S.002 Init +   2374   2442   69  0  0   55   95   -11 0.132   2.40
S.003 Intr +   3894   4110  217  2  1   -3  -34   307 0.177  11.55
S.004 Intr +   4352   4914  563  0  2   75   59   338 0.187  26.20
S.005 Intr +   5005   5379  375  0  0   70    8   335 0.212  22.99
S.006 Intr +   5442   6056  615  2  0   95   99   589 0.208  57.32
```



34

CEITEC

Explanation Gn.Ex : gene number, exon number (for reference) **Type** : Init = Initial exon (ATG to 5' splice site) Intr = Internal exon (3' splice site to 5' splice site) Term = Terminal exon (3' splice site to stop codon) Sngl = Single-exon gene (ATG to stop) Prom = Promoter (TATA box / initation site) PlyA = poly-A signal (consensus: AATAAA) **S** : DNA strand (+ = input strand; - = opposite strand) **Begin** : beginning of exon or signal (numbered on input strand) **End** : end point of exon or signal (numbered on input strand) **Len** : length of exon or signal (bp) **Fr** : reading frame (a forward strand codon ending at x has frame x mod 3). For example, if nucleotides 1,2,3 of the sequence are read as a codon, that's called reading frame 0. If 2,3,4 are read as a codon, that's reading frame 1. If 3,4,5 are read as a codon, that's reading frame 2, and so on. This information, together with the starting and ending positions of the exon, is sufficient to give the amino acid sequence encoded by the exon. Another use of the reading frame is that if you see two adjacent predicted exons separated by a relatively short intron which share the same reading frame, it may be worth looking at the possibility that the intervening intron is not correct, i.e. that the two exons plus the intervening intron might form one long exon (assuming there are no inframe stops in the intron, of course). **Ph** : net phase of exon (exon length modulo 3). For example, an exon of length 15 bp has net phase 0 since 15 is divisible by 3, an exon of length 16 bp has net phase 1 because 16 divided by 3 leaves a remainder of 1, an exon of length 17 bp has net phase 2, and an exon of length 18 bp has net phase 0 again. The point of this is that exons whose net phase is 0 can be omitted from the gene without disrupting the reading frame: such exons are candidates for being either 1) incorrect, or 2) alternatively spliced. **I/Ac** : initiation signal or 3' splice site score (tenth bit units; x 10). If below zero, probably not a real acceptor site. **Do/T** : 5' splice site or termination signal score (tenth bit units; x 10) If below zero, probably not a real donor site. **CodRg** : coding region score (tenth bit units) **P** : probability of exon (sum over all parses containing exon). This quantity is close to the actual probability that the predicted exon is correct. **Tscr** : exon score (depends on length, I/Ac, Do/T and CodRg scores).

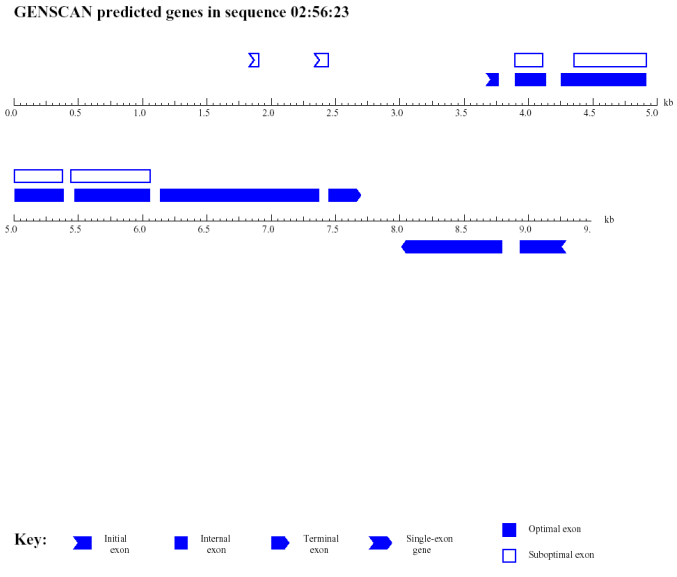
Comments The SCORE of a predicted feature (e.g., exon or splice site) is a log-odds measure of the quality of the feature based on local sequence properties. For example, a predicted 5' splice site with score > 100 is strong; 50-100 is moderate; 0-50 is weak; and below 0 is poor (more than likely not a real donor site). The PROBABILITY of a predicted exon is the estimated probability under GENSCAN's model of genomic sequence structure that the exon is correct. This probability depends in general on global as well as local sequence properties, e.g., it depends on how well the exon fits with neighboring exons. It has been shown that predicted exons with higher probabilities are more likely to be correct than those with lower probabilities.

What are the suboptimal exons?

Under the probabilistic model of gene structural and compositional properties used by GENSCAN, each possible "parse" (gene structure description) which is compatible with the sequence is assigned a probability. The default output of the program is simply the "optimal" (highest probability) parse of the sequence. The exons in this optimal parse are referred to as "optimal exons" and the translation products of the corresponding "optimal genes" are printed as GENSCAN predicted peptides. (All the data in our J Mol Biol paper and on the other GENSCAN web pages refer exclusively to the optimal parse/optimal exons.) Of course, the optimal parse does not always correspond to the actual (biological) parse of the sequence, that is, the actual set of exons/genes present. In addition, there may be more than one parse which can be considered "correct", for example, in the case of a gene which is alternatively transcribed, translated or spliced. For both of these reasons, it may be of interest to consider "suboptimal" ("near-optimal") exons as well, i.e. exons which have reasonably high probability but are not present in the optimal parse. Specifically, for every potential exon E in the sequence, the probability P(E) is defined as the sum of the probabilities under the model of all possible "parses" (gene structures) which contain the exact exon E in the correct reading frame. (This quantity is calculated as described on the GENSCAN exon probability page.) Given a probability cutoff C, suboptimal exons are those potential exons with P(E) > C which are not present in the optimal parse.

Suboptimal exons have a variety of potential uses. First, suboptimal exons sometimes correspond to real exons which were missed for whatever reason by the optimal parse of the sequence. Second, regions of a prediction which contain multiple overlapping and/or incompatible optimal and suboptimal exons may in some cases indicate alternatively spliced regions of a gene (Burge & Karlin, in preparation). The probability cutoff C used to determine which potential exons qualify as suboptimal exons can be set to any of a range of values between 0.01 and 1.00. The default value on the web page is 1.00, meaning that no suboptimal exons are printed. For most applications, a cutoff value of about 0.10 is recommended. Setting the value much lower than 0.10 will often lead to an explosion in the number of suboptimal exons, most of which will probably not be useful. On the other hand, if the value is set much higher than 0.10, then potentially interesting suboptimal exons may be missed.

GENESCAN



Regulace translace

Funkční význam sestřihu v nepřekládaných oblastech - důležitá regulační součást genů

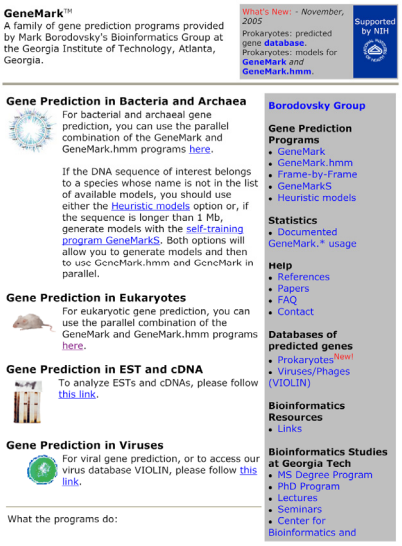
- Translační represe prostřednictvím krátkých ORF v 5'UTR
- Identifikováno např. u kukuřice (Wang and Wessler, 1998, viz doporučená lit.)
- V případě CKI1 pokus prokázat tento způsob regulace genové exprese pomocí transgenních linií nesoucích *uidA* pod kontrolou dvou verzí promotoru, zatím nepotvrzeno

CEITEC

Genové modelování

- programy pro genové modelování
  - zohledňují také další parametry, např. návaznost ORF
    - Genescan (http://hollywood.mit.edu/GENSCAN.html)
      velice dobrý pro predikci exonů v kódujích oblastech
      (testováno na genu *PDR9*, identifikoval všech 23 (!) exonů
    - GeneMark.hmm (http://opal.biology.gatech.edu/GeneMark/)
    - GlimmerHMM (https://ccb.jhu.edu/software/glimmerhmm/)

GeneMark

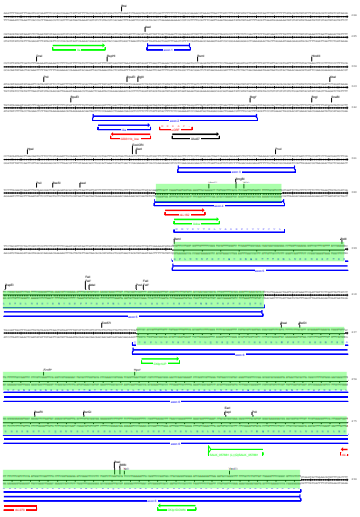


CEITEC

GENESCAN

GENSCANW output for sequence CKI1

```
GENSCAN 1.0     Date run: 10-Nov-105     Time: 02:24:26

Sequence CKI1 : 9490 bp : 36.53% C+G : Isochore 1 ( 0 - 43 C+G%)

Parameter matrix: Arabidopsis.smat

Predicted genes/exons:


Gn.Ex Type S .Begin ...End .Len Fr Ph I/Ac Do/T CodRg P.... Tscr..
----- ---- - ------ ------ ---- -- -- ---- ---- ----- ----- ------

 1.00 Prom +   1497   1536   40                                -3.85
 1.01 Init +   3708   3764   57  2  0   63   51    37 0.499   4.03
 1.02 Intr +   3894   4133  240  2  0   -3    7   327 0.713  17.32
 1.03 Intr +   4255   4914  660  0  0   86   59   296 0.771  22.57
 1.04 Intr +   5005   5383  379  0  1   70   91   343 0.772  31.41
 1.05 Intr +   5473   6056  584  2  2   38   99   582 0.722  50.76
 1.06 Intr +   6136   7368 1233  0  0   68  108   655 0.977  56.86
 1.07 Term +   7448   7660  213  1  0   43   35   212 0.999  12.65
 1.08 PlyA +   7910   7915    6                                -0.45

 2.03 PlyA -   7976   7971    6                                -4.83
 2.02 Term -   8793   8050  744  0  0  107   37   542 0.997  48.46
 2.01 Init -   9253   8936  318  1  0  105   73   386 0.999  41.18

Suboptimal exons with probability > 0.100

Exnum Type S .Begin ...End .Len Fr Ph B/Ac Do/T CodRg P.... Tscr..
----- ---- - ------ ------ ---- -- -- ---- ---- ----- ----- ------

S.001 Init +   1867   1905   39  0  0   64   40    57 0.298   3.74
S.002 Init +   2374   2442   69  0  0   55   95   -11 0.132   2.40
S.003 Intr +   3894   4110  217  2  1   -3  -34   307 0.177  11.55
S.004 Intr +   4352   4914  563  0  2   75   59   338 0.187  26.20
S.005 Intr +   5005   5379  375  0  0   70    8   335 0.212  22.99
S.006 Intr +   5442   6056  615  2  0   95   99   589 0.208  57.32
```



Explanation Gn.Ex : gene number, exon number (for reference) **Type** : Init = Initial exon (ATG to 5' splice site) Intr = Internal exon (3' splice site to 5' splice site) Term = Terminal exon (3' splice site to stop codon) Sngl = Single-exon gene (ATG to stop) Prom = Promoter (TATA box / initation site) PlyA = poly-A signal (consensus: AATAAA) **S** : DNA strand (+ = input strand; - = opposite strand) **Begin** : beginning of exon or signal (numbered on input strand) **End** : end point of exon or signal (numbered on input strand) **Len** : length of exon or signal (bp) **Fr** : reading frame (a forward strand codon ending at x has frame x mod 3). For example, if nucleotides 1,2,3 of the sequence are read as a codon, that's called reading frame 0. If 2,3,4 are read as a codon, that's reading frame 1. If 3,4,5 are read as a codon, that's reading frame 2, and so on. This information, together with the starting and ending positions of the exon, is sufficient to give the amino acid sequence encoded by the exon. Another use of the reading frame is that if you see two adjacent predicted exons separated by a relatively short intron which share the same reading frame, it may be worth looking at the possibility that the intervening intron is not correct, i.e. that the two exons plus the intervening intron might form one long exon (assuming there are no inframe stops in the intron, of course). **Ph** : net phase of exon (exon length modulo 3). For example, an exon of length 15 bp has net phase 0 since 15 is divisible by 3, an exon of length 16 bp has net phase 1 because 16 divided by 3 leaves a remainder of 1, an exon of length 17 bp has net phase 2, and an exon of length 18 bp has net phase 0 again. The point of this is that exons whose net phase is 0 can be omitted from the gene without disrupting the reading frame: such exons are candidates for being either 1) incorrect, or 2) alternatively spliced. **I/Ac** : initiation signal or 3' splice site score (tenth bit units; x 10). If below zero, probably not a real acceptor site. **Do/T** : 5' splice site or termination signal score (tenth bit units; x 10) If below zero, probably not a real donor site. **CodRg** : coding region score (tenth bit units) **P** : probability of exon (sum over all parses containing exon). This quantity is close to the actual probability that the predicted exon is correct. **Tscr** : exon score (depends on length, I/Ac, Do/T and CodRg scores).

Comments The SCORE of a predicted feature (e.g., exon or splice site) is a log-odds measure of the quality of the feature based on local sequence properties. For example, a predicted 5' splice site with score > 100 is strong; 50-100 is moderate; 0-50 is weak; and below 0 is poor (more than likely not a real donor site). The PROBABILITY of a predicted exon is the estimated probability under GENSCAN's model of genomic sequence structure that the exon is correct. This probability depends in general on global as well as local sequence properties, e.g., it depends on how well the exon fits with neighboring exons. It has been shown that predicted exons with higher probabilities are more likely to be correct than those with lower probabilities.

What are the suboptimal exons?

Under the probabilistic model of gene structural and compositional properties used by GENSCAN, each possible "parse" (gene structure description) which is compatible with the sequence is assigned a probability. The default output of the program is simply the "optimal" (highest probability) parse of the sequence. The exons in this optimal parse are referred to as "optimal exons" and the translation products of the corresponding "optimal genes" are printed as GENSCAN predicted peptides. (All the data in our J Mol Biol paper and on the other GENSCAN web pages refer exclusively to the optimal parse/optimal exons.) Of course, the optimal parse does not always correspond to the actual (biological) parse of the sequence, that is, the actual set of exons/genes present. In addition, there may be more than one parse which can be considered "correct", for example, in the case of a gene which is alternatively transcribed, translated or spliced. For both of these reasons, it may be of interest to consider "suboptimal" ("near-optimal") exons as well, i.e. exons which have reasonably high probability but are not present in the optimal parse. Specifically, for every potential exon E in the sequence, the probability P(E) is defined as the sum of the probabilities under the model of all possible "parses" (gene structures) which contain the exact exon E in the correct reading frame. (This quantity is calculated as described on the GENSCAN exon probability page.) Given a probability cutoff C, suboptimal exons are those potential exons with P(E) > C which are not present in the optimal parse.

Suboptimal exons have a variety of potential uses. First, suboptimal exons sometimes correspond to real exons which were missed for whatever reason by the optimal parse of the sequence. Second, regions of a prediction which contain multiple overlapping and/or incompatible optimal and suboptimal exons may in some cases indicate alternatively spliced regions of a gene (Burge & Karlin, in preparation). The probability cutoff C used to determine which potential exons qualify as suboptimal exons can be set to any of a range of values between 0.01 and 1.00. The default value on the web page is 1.00, meaning that no suboptimal exons are printed. For most applications, a cutoff value of about 0.10 is recommended. Setting the value much lower than 0.10 will often lead to an explosion in the number of suboptimal exons, most of which will probably not be useful. On the other hand, if the value is set much higher than 0.10, then potentially interesting suboptimal exons may be missed.

GeneMark

Result of last submission:

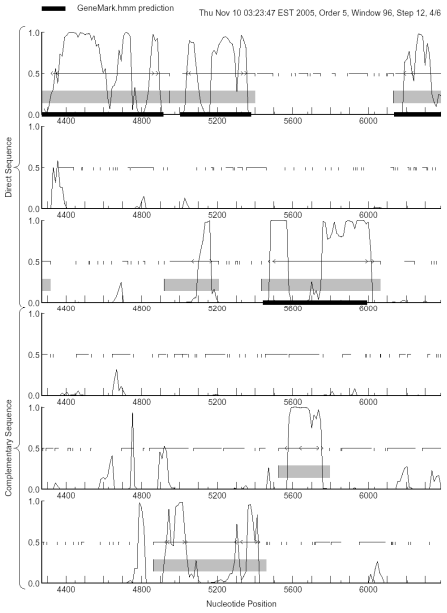
View PDF Graphical Output

GeneMark.hmm Listing

Go to: GeneMark.hmm Protein Translations

Go to: Job Submission

```
Eukariotyc GeneMark.hmm version bp 3.9 April 25, 2008
Sequence name: CK11
Sequence length: 5043 bp
G+C content: 38.79%
Matrices file: /home/genmark/euk_ghm.matrices/athaliana_hmm3.0mod
Thu Oct  1 11:09:24 2009


Predicted genes/exons

Gene Exon Strand Exon          Exon Range          Exon      Start/End
  #    #         Type                             Length      Frame


  1    1    +   Initial          969 1025 57 1 3 - -
  1    2    +   Internal        1155       1394       240          1 3 - -
  1    3    +   Internal        1515       2175       660          1 3 - -
  1    4    +   Internal        2266       2644       379          1 1 - -
  1    5    +   Internal        2704       3317       584          2 3 - -
  1    6    +   Internal        3397       4629      1233          1 3 - -
  1    7    +   Terminal        4709       4921       213          1 3 - -
```



CEITEC

Genové homologie

- vyhledávání genů podle homologií
  - porovnávání s EST databázemi
    - BLASTN (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)
  - porovnávání s proteinovými databázemi
    - BLASTX (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)
    - Genewise (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/genewise/)

      porovnávají proteinovou sekvenci s genomovou DNA (po zpětném překladu), je nutná znalost aminokyselinové sekvence
  - porovnávání s homologními genomovými sekvencemi z příbuzných druhů
    - VISTA (http://genome.lbl.gov/vista/index.shtml)

Osnova

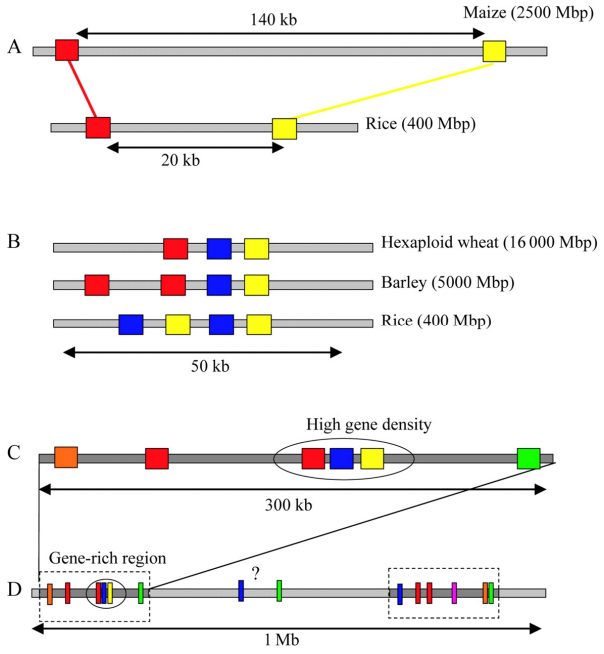
- Postupy „přímé“ a reverzní genetiky
  - rozdíly v myšlenkových přístupech k identifikaci genů a jejich funkcí
- Identifikace genů *ab initio*
  - struktura genů a jejich vyhledávání
  - genomová kolinearita a genová homologie

CEITEC

Genomová kolinearita

- genomy příbuzných druhů se přes značné odlišnosti vyznačují podobnostmi v uspořádání i sekvencích, možnost využití při identifikaci genů u příbuzných organizmů pomocí vyhledávání v databázích
- **Obecné schéma** postupu při využívání genomové kolinearity (také „komparativní genomika“) při experimentální identifikaci genů příbuzných organizmů:
  - mapování malých genomů s využitím nízkokopiových DNA markerů (např. RFLP)
  - využití těchto markerů k identifikaci orthologních genů (genů se stejnou nebo podobnou funkcí) příbuzného organizmu
  - malý genom (např. rýže, 466 Mbp) může sloužit jako vodítko, kdy jsou identifikovány molekulární nízkokopiové markery (např. RFLP) ve vazbě s genem zájmu a tyto oblasti jsou pak použity jako sonda při vyhledávání v BAC knihovnách při identifikaci orthologních oblastí velkých genomů (např. ječmene nebo pšenice, 5000, resp. 16000 Mbp)

Genomová kolinearita

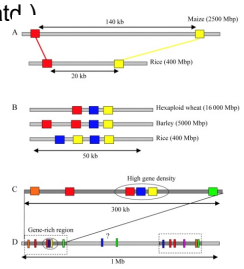


Feuillet and Keller, 2002

CEITEC

Genomová kolinearita

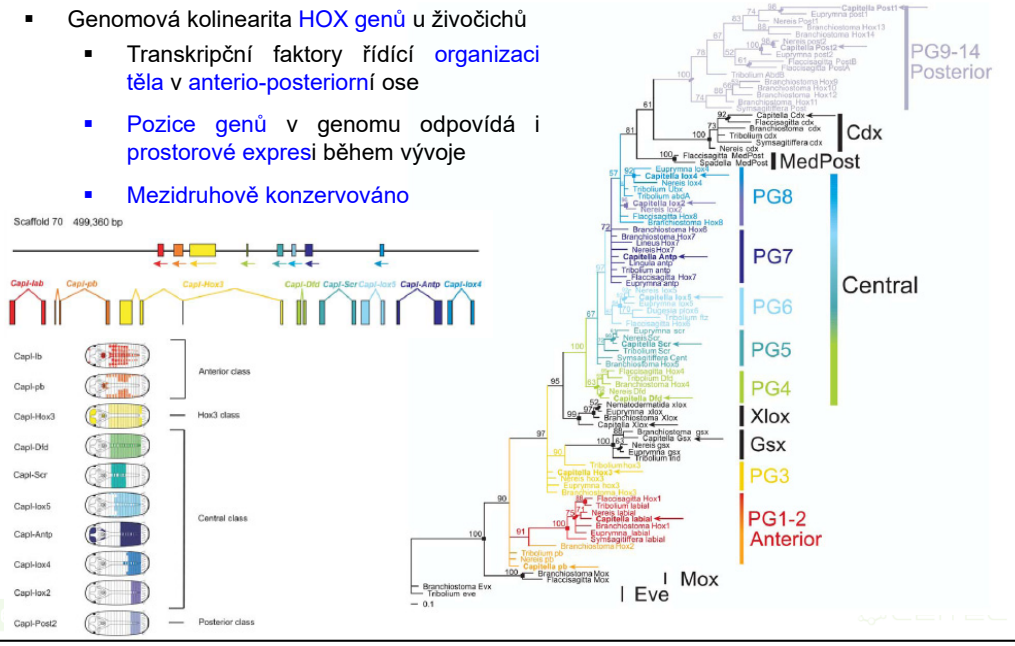
- zejména využitelné u trav (např. využití příbuznosti u ječmene, pšenice, rýže a kukuřice)
- malé geonomové přestavby (dalece, duplikace, inverze a translokace menší než několik cM) jsou pak detekovány podrobnou sekvenční komparativní analýzou
- během evoluce dochází u příbuzných druhů k odchylkám především v nekódujících oblastech (invaze retrotranspozonů atd.)



CEITEC

Genomová kolinearita

- Genomová kolinearita HOX genů u živočichů
  - Transkripční faktory řídící organizaci těla v anterio-posteriorní ose
  - Pozice genů v genomu odpovídá i prostorové expresi během vývoje
  - Mezidruhově konzervováno



Genomic organization of the Capitella sp. I Hox cluster. A total of 11 Capitella sp. I Hox genes are distributed among three scaffolds. Black lines depict two scaffolds, which contain 10 of the Capitella sp. I Hox genes. The eleventh gene, CapI-Post1, is located on a separate scaffold surrounded by ORFs of non-Hox genes (unpublished data). No predicted ORFs were identified between adjacent linked Hox genes. Transcription units are shown as boxes denoting exons, connected by lines that denote introns. Transcription orientation is denoted by arrows beneath each box. Color coding is the same as that used in on the right-hand side for each ortholog.

The phylogenic tree on the right-hand side shows that the order of the genes on the chromozome is retained in several species (genome colinearity).

Osnova

- Postupy „přímé“ a reverzní genetiky
  - rozdíly v myšlenkových přístupech k identifikaci genů a jejich funkcí
- Identifikace genů *ab initio*
  - struktura genů a jejich vyhledávání
  - genomová kolinearita a genová homologie
- Experimentální identifikace genů
  - příprava genově obohacených knihoven pomocí technologie metylačního filtrování

CEITEC

Metylační filtrování

- příprava genově obohacených knihoven pomocí technologie metylačního filtrování
  - geny jsou (většinou!) hypometylované, kdežto nekódující oblasti jsou metylované
  - využití bakteriálního RM systému, který rozpoznává metylovanou DNA pomocí rest. enzymů McrA a McrBC
    - McrBC rozpoznává v DNA metylovaný cytozin, který předchází purin (G nebo A)
    - pro štěpení je nutná vzdálenost těchto míst z 40-2000 bp

Metylační filtrování

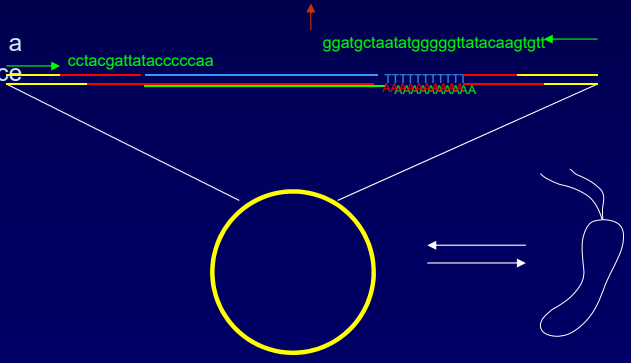
- příprava genově obohacených knihoven pomocí technologie metylačního filtrování
  - **Schéma postupu** při přípravě BAC genomových knihoven pomocí metylačního filtrování:
    - příprava genomové DNA bez příměsí organelární DNA (chloroplasty a mitochondrie)
    - fragmentace DNA (1-4 kbp) a ligace adaptorů
    - příprava BAC knihovny v *mcrBC+* kmeni *E. coli*
    - selekce pozitivních klonů
  - omezené využití: obohacení o kódující DNA o pouze cca 5-10 %

Osnova

- Postupy „přímé“ a reverzní genetiky
  - rozdíly v myšlenkových přístupech k identifikaci genů a jejich funkcí
- Identifikace genů *ab initio*
  - struktura genů a jejich vyhledávání
  - genomová kolinearita a genová homologie
- Experimentální identifikace genů
  - příprava genově obohacených knihoven pomocí technologie metylačního filtrování
  - EST knihovny

EST knihovny

- příprava EST knihoven
  - izolace mRNA
  - RT
  - ligace linkerů a syntéza druhého řetězce cDNA
  - klonování do vhodného bakteriálního vektoru
  - transformace do bakterií a izolace DNA (amplifikace DNA)
  - sekvenace s použitím primerů specifických pro použitý plasmid
  - uložení výsledků sekvenace do veřejné databáze



Klíčové koncepty

- Přímá vs. reverzní genetika
  - Gen jako faktor určující frekvenci fenotypu vs. fyzická entita, která existuje nezávisle na fenotypu
- Identifikace genů *ab initio*
  - struktura genů a často i jejich poloha v genomu je konzervovaná
- Experimentální identifikace genů
  - lze připravit genově obohacené knihovny
  - EST knihovny umožňují identifikaci transkripčně aktivních genů
  - přímá a reverzní genetika (přednáška 03)

Diskuse